

Foto: Fábio Mendonça Diniz



## Extração Não Letal de DNA em Abelhas do Gênero *Melipona*

*Marineide Rodrigues Amorim*<sup>1</sup>

*Teresa Cristina Alves Lima*<sup>1</sup>

*Geice Ribeiro Silva*<sup>2</sup>

*Glícia Maria Almeida*<sup>3</sup>

*José Maria Vieira Neto*<sup>4</sup>

*Fábia de Mello Pereira*<sup>5</sup>

*Paulo Sarmanho da Costa Lima*<sup>5</sup>

*Fábio Barros Brito*<sup>5</sup>

*Maria Teresa do Rêgo Lopes*<sup>5</sup>

*Ricardo Costa Camargo*<sup>5</sup>

*Fábio Mendonça Diniz*<sup>5</sup>

### Introdução

Entre as abelhas sociais, além da conhecida *Apis mellifera*, estão as da tribo Meliponini, que agrupam vários gêneros de abelhas sem ferrão, também conhecidas como abelhas indígenas, com grande heterogeneidade de cor, tamanho, forma, hábitos de nidificação e população dos ninhos (Nogueira-Neto, 1997). Habitantes das regiões tropicais e subtropicais do mundo, estima-se que, só no Brasil, existam mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão (Coletto-Silva, 2005). Nesse grupo, as mais conhecidas são a jandaíra (*Melipona subnitida*), urucu-amarela (*Melipona rufiventris*), urucu (*Melipona scutellaris*), tiúba (*Melipona compressipes*) e manduri (*Melipona asilvai*), todas típicas da Região Nordeste (Pereira, 2006).

Algumas espécies são pouco agressivas e adaptam-se bem a colmeias racionais. Além de produzirem mel de excelente qualidade, com potencial terapêutico, essas abelhas podem fornecer pólen, cerume, geoprópolis e os próprios enxames para a exploração comercial.

A polinização é outro recurso importante fornecido pelos meliponídeos (Nogueira-Neto, 1997).

Geralmente, a amostragem de DNA de abelhas baseia-se em métodos letais ou invasivos (Châline et al., 2002). Contudo, a amostragem não letal para identificar o DNA está tornando-se cada vez mais importante para estudos populacionais, de conservação e de comportamento (Gerken et al., 1998; Lushai et al., 2000; Starks e Peters, 2002).

Em insetos sociais, a sobrevivência dos indivíduos amostrados nem sempre é importante. Em espécies com um grande número de operárias, como a do gênero *Apis*, os indivíduos podem ser sacrificados para fornecer as amostras necessárias para vários tipos de análises genéticas, tais como, a determinação de parentesco e a relação entre a geração (Châline et al., 2004; Foster et al., 2001; Bourke et al., 1997). No entanto, a amostragem letal pode causar problemas quando colônias pequenas são estudadas, como é o caso das abelhas do gênero *Melipona*. Esse tipo de

<sup>1</sup>Especialista em Genética e Evolução - Universidade Federal do Piauí – Campus Universitário Petrônio Portella B. Ininga, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí.

<sup>2</sup>Bolsista do Laboratório de Biologia Molecular & Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220, Teresina, Piauí.

<sup>3</sup>Mestranda em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí – Campus Universitário Petrônio Portella B. Ininga, CEP 64.049-550, Teresina, Piauí.

<sup>4</sup>Estagiário do Núcleo de Pesquisa com Abelhas da Embrapa Meio-Norte, Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220, Teresina, Piauí.

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Laboratório de Biologia Molecular & Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220, Teresina, Piauí.

análise também é inadequado para a genotipagem de rainhas destinadas a liderar colônias ou operárias cujo comportamento subsequente deve ser estudado (Starks e Peters, 2002). Além disso, a amostragem prolongada de uma população pode alterar a estrutura da população subsequente (Starks e Peters, 2002).

Para animais pequenos como insetos, um desafio metodológico é o desenvolvimento de métodos de amostragem de tecidos que não afetem a sobrevivência dos indivíduos enquanto ainda fornecem DNA de qualidade adequada para análise genética (Gerken et al., 1998). Os protocolos tradicionais de extração de DNA para o estudo de diversidade genética de *Melipona* comprometem o desempenho da colmeia. No entanto, estudos revelam que a utilização das extremidades das asas e da porção terminal da perna (tarso) não afeta o desempenho dessas abelhas.

O propósito deste trabalho foi identificar a viabilidade de protocolos de extração não letal de DNA em abelhas *Melipona*, utilizando-se o tarso e a extremidade da asa, e verificar a qualidade do material extraído para reações de polimerase em cadeia (PCR), especificamente uma região do DNA mitocondrial frequentemente utilizada em estudos de evolução molecular.

## Material e Métodos

Foram coletadas espécimens de abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*), urucu-amarela (*Melipona rufiventris*), urucu (*Melipona scutellaris*), tiúba (*Melipona compressipes*) e manduri (*Melipona asilva*) no campo experimental da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, Piauí. As amostras foram armazenadas em álcool absoluto à temperatura ambiente e processadas no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, em Teresina, PI, onde protocolos de extração de DNA foram testados. O DNA extraído foi utilizado como molde para amplificação da região LSUrRNA do DNA mitocondrial, visando à verificação da viabilidade do material extraído.

Para todos os protocolos de extração, foram retirados uma porção de 10 % da asa do indivíduo (Fig. 1) e o tarso das espécies de abelha mencionadas acima. O material foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo para o rompimento da camada de quitina e para facilitar a exposição das células aos reagentes. A asa inteira e o tórax foram usados como padrão de comparação.



**Fig. 1.** Vista inferior da asa de um espécime de abelha sem-ferrão (*Melipona* sp.) demonstrando o corte do material utilizado para a extração de DNA.

Os protocolos 1, 2 e 3, descritos por Waldschmidt et al. (1997), diferiram entre si apenas pelo tampão utilizado nos primeiros passos da extração:

- Protocolo 1: tampão A (2 % CTAB, 100 mM tris-pH 8, 20 mM de EDTA, 1,4 M de NaCl, proteinase K).
- Protocolo 2: tampão B (1 % CTAB, 50 mM tris-pH 8, 10 mM de EDTA, 0,75 M de NaCl, proteinase K).
- Protocolo 3: tampão C (2 % SDS, 50 mM tris-pH 8, 10 mM de EDTA, 0,75 M de NaCl, proteinase K).

Em cada amostra macerada em nitrogênio, foram adicionados 300 µL do tampão de extração (A, B ou C). O material foi homogeneizado em *vortex* por alguns minutos e foram adicionados 20 µL de proteinase K, incubando a 55 °C por 3 horas para a digestão completa das proteínas. Em seguida, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e 300 µL de fenol (Sambrook et al. 1989). Cada tubo foi homogeneizado em *vortex* por 10 s e misturado por 30 minutos em agitador. Centrifugou-se a 18.600 x g por 15 minutos, transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionaram-se 300 µL de clorofórmio-álcool isoamílico. As amostras foram novamente homogeneizadas em *vortex* por 10 segundos, misturadas em agitador por 15 minutos e centrifugadas a 18.600 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 1 mL de isopropanol e 3 µL de acetato de sódio 3 M.

O tubo foi invertido dez vezes e então colocado no freezer por 30 minutos. Centrifugou-se a 7.700 x g por 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1 mL de etanol 70 %. Após centrifugar à velocidade máxima por 15 minutos descartou-se o etanol e secou-se o *pellet* à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de tampão de eluição (Invitrogen®).

#### ■ Protocolo 4: Chelex®100 (Walsh et al., 1991)

Volumes diferentes de solução Chelex® 100, em diferentes concentrações 10 % ou 20 %, foram adicionados de acordo com a natureza da amostra: 100 µL para as amostras do tarso e 50 µL para as amostras da ponta da asa. As amostras foram então incubadas a 55 °C por 3 horas com constante agitação, misturadas em *vortex* por 20 segundos, aquecidas de 95 °C a 100 °C por 30 minutos e misturadas novamente em *vortex* por 20 segundos. Após 2 minutos de centrifugação à velocidade máxima, 18.600 x g, foram transferidos 20 µL do sobrenadante para um tubo de 200 µL.

#### ■ Protocolo 5: Chelex®100 com adição de proteinase K (Walsh et al., 1991)

Antes de seguir com o protocolo original, acrescentou-se proteinase K nas amostras. Da mesma forma que o Protocolo 4, volumes diferentes de solução Chelex® 100 foram adicionados de acordo com a natureza da amostra. As amostras foram então incubadas a 55 °C *overnight* e misturadas em *vortex* por 20 segundos. Em seguida, foram fervidas a uma temperatura entre 95 °C e 100 °C por 15 minutos e misturadas novamente em *vortex* por 10 segundos. Após 3 minutos de centrifugação a 7.700 x g, transferiram-se 20 µL do sobrenadante para um tubo de 200 µL.

#### ■ Protocolo 6: kit de extração de DNA Puregene (Gentra®)

Os procedimentos de extração do kit encontram-se descritos em detalhes pelo fabricante em manual próprio. Resumidamente, adicionaram-se 300 µL de solução de lise celular e 20 µL de proteinase K, incubou-se por 3 horas a 55 °C. Acrescentaram-se 100 µL de solução de precipitação de proteínas seguidos de *vortex* e centrifugação por 16.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionaram-se 300 µL de isopropanol. O material foi novamente lavado com etanol a 70 % e centrifugado. Descartou-se o sobrenadante, e 50 µL de Tris foram adicionados ao *pellet*.

Após a extração, a quantidade e a qualidade do DNA obtido foram visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1 %. A viabilidade do DNA extraído como molde para reações de PCR foi verificada por meio da amplificação da região LSUrRNA do DNA mitocondrial para todas as abelhas amostradas, com os iniciadores (*primer*) 16S-ar

(5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S-br (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), previamente descritos por Palumbi (1996). Em um volume de reação de 20 µL, foram usados 2,0 µL de DNA extraído, tampão para PCR 1x, 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada *primer*, 800 mM de cada dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Thermoprime plus, Advanced Biotechnologies). Todas as reações foram imediatamente desnaturadas a 94 °C por 4 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, 50 °C de anelamento por 1 minuto e alongação de 72 °C por 1 minuto; por último, a alongação final durante 7 minutos a 72 °C.

Após PCR, o DNA amplificado, obtido a partir de cada protocolo, foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 1%, onde o DNA foi corado com 3 µL de brometo de etídio (Sambrook et al., 1989). Utilizaram-se 10 µL de cada amostra para a realização da eletroforese.

## Resultados e Discussão

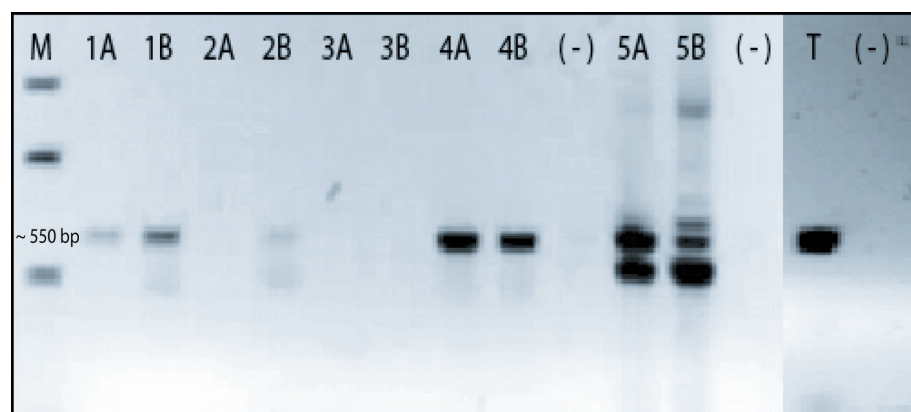
A extração de DNA a partir da extremidade da asa e do tarso de abelhas do gênero *Melipona* mostrou-se eficaz para os protocolos que utilizaram o polímero Chelex® 100 (Tabela 1). A digestão com proteinase K mostrou ser um passo eficiente no processo de extração. A extração de DNA, por meio dos protocolos utilizando soluções tampões (A, B e C), não apresentou resultados positivos, provavelmente em razão da degradação do material genômico ou da sua perda durante o processo de extração.

O resultado das amplificações da região LSUrRNA do *mtDNA*, tendo como molde o DNA genômico extraído a partir de 10 % da asa, pelos protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K, em concentrações de 10 % e 20 %, tendo como controle o DNA extraído a partir da asa inteira, mostrou-se satisfatório. Observou-se que o DNA obtido com esse método permitiu a visualização de material de boa qualidade, em que houve a formação de bandas sem padrão de *smear*. Entretanto, nas amostras 5A e 5B, observou-se a presença de algumas bandas que podem ter sido ocasionadas por um anelamento parcial dos *primers* em decorrência da diminuição da temperatura durante a PCR (Fig. 2).

**Tabela 1.** Comparação entre os protocolos utilizados. O sinal positivo (+) indica a ocorrência de amplificação de DNA. O sinal de negativo (-) indica a ausência de amplificação.

Espécie	Parte do corpo	Protocolos*					
		1	2	3	4	5	6
Jandaíra ( <i>Melipona subnitida</i> )	Ponta Asa	—	—	—	—	+	—
	Asa inteira	—	—	—	—	+	—
	Tarso	—	—	—	—	+	—
Uruçu-amarela ( <i>Melipona rufiventris</i> )	Ponta Asa	—	—	—	+	—	—
	Asa inteira	—	—	—	+	—	—
	Tarso	—	—	—	—	—	—
Uruçu ( <i>Melipona scutellaris</i> )	Ponta Asa	—	—	—	—	+	+
	Asa inteira	—	—	—	—	+	—
	Tarso	—	—	—	—	—	—
Tiúba ( <i>Melipona compressipes</i> )	Ponta Asa	—	—	—	—	—	—
	Asa inteira	—	—	—	+	—	—
	Tarso	—	—	—	—	—	—
Manduri ( <i>Melipona asilvai</i> )	Ponta Asa	—	—	—	—	—	+
	Asa inteira	—	—	—	—	—	—
	Tarso	—	—	—	—	—	—

\*1: Waldschmidt et al. (1997) – Tampão A; 2: Waldschmidt et al. (1997) – Tampão B; 3: Waldschmidt et al. (1997) – Tampão C; 4: Chelex®100 (Walsh et al., 1991); 5: Chelex®100 (Walsh et al., 1991) com adição de proteinase K; 6: Puregene (Gentra®).

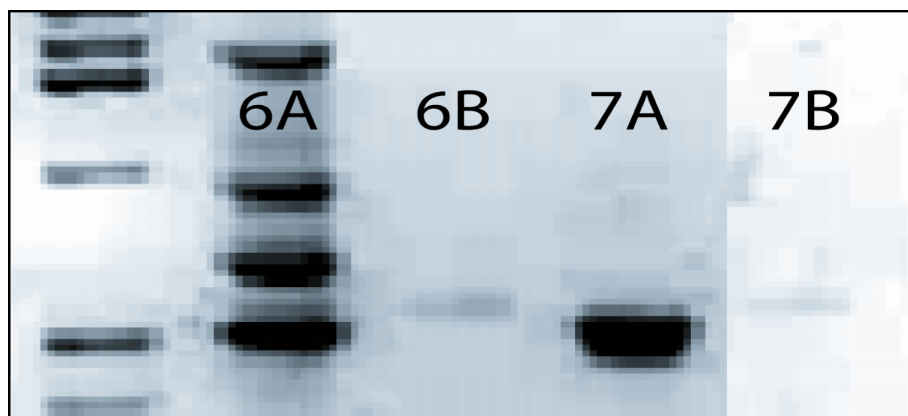


**Fig. 2.** Amplificação do DNA mitocondrial (região LSUrRNA) tendo como molde DNA extraído a partir dos protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K em concentração de 10 e 20%. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem, respectivamente, à uruçu-amarela (*Melipona rufiventris*), tiúba (*Melipona compressipes*), manduri (*Melipona asilvai*), jandaíra (*Melipona subnitida*) e uruçu (*Melipona scutellaris*). A e B correspondem à porção de 10% da asa e asa inteira, respectivamente, de cada espécie citada acima. T, corresponde ao tarso de jandaíra. 1 e 2 utilizou Chelex® 100, 3, 4, 5 e T utilizou Chelex® 100 + proteinase K.

A extração de DNA do tarso usando-se o protocolo Chelex® 100 + proteinase K apresentou DNA de boa qualidade (Fig. 2). No entanto, a amplificação só ocorreu em uma espécie. Isso pode ter ocorrido em razão do processo de maceração do material, que pode não ter sido suficientemente eficaz, ou em virtude de a quantidade de DNA extraído não ter sido suficiente para a amplificação nas outras espécies.

Na extração pelo kit Puregene, obteve-se amplificação de apenas duas das amostras testadas. Na primeira, observou-se a presença de bandas não específicas, que também podem ter sido amplificadas em decorrência da baixa temperatura de anelamento durante a PCR. A não-amplificação das demais amostras pode ter ocorrido pela perda de DNA durante os procedimentos de extração, em que houve constante troca de tubos (Fig. 3).





**Fig. 3.** Amplificação do DNA mitocondrial (região LSUrRNA) tendo como molde DNA extraído a partir do *Kit Puregene*. Os números 6 e 7 correspondem às espécies, urucu (*Melipona scutellaris*) e manduri (*Melipona asilva*), respectivamente. **A** corresponde ao tórax e **B** à porção de 10% da asa das espécies citadas acima.

Os métodos de amostragem não letais de DNA de indivíduos de abelhas do gênero *Melipona* são requeridos tanto por estudos de conservação genética como de comportamento. Verificou-se que a região LSUrRNA do DNA mitocondrial poderia ser amplificada confiavelmente da ponta da perna (tarso) e da asa de abelhas *Melipona*.

Os protocolos Chelex® 100 e Chelex® 100 + proteinase K extraíram DNA de qualidade e em quantidade suficiente para a utilização do material como molde para reações de PCR. O protocolo Chelex® 100 apresenta grande vantagem uma vez que o tempo de extração é extremamente curto em relação aos demais, além do baixo custo. No entanto, a amplificação não ocorreu com todas as espécies de abelhas citadas, indicando a necessidade de otimização desse protocolo a outras espécies do mesmo gênero.

## Referências

- BOURKE, A.F.G.; GREEN H.A.A.; BRUFORD M.W. Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analysed with microsatellites, *Proc. R. Soc. London B* 264, 277-283, 1997.
- CHÂLINE, N.; RATNIEKS, F.L.W.; BURKE, T. Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honeybee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites. *Mol. Ecol.* 11, 1795-1803, 2002.
- CHÂLINE, N.; RATNIEKS, F.L.W.; RAINE, N.E.; BADCOCK, N.S.; BURKE, T. Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips. *Apidologie* 35, 311-318, 2004.
- COLETTTO-SILVA, A. Captura de Enxames de Abelhas Sem Ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem Destruição de Árvores. *Acta Amazonica*, 35(3): 383 – 388, 2005.
- FOSTER, K.R.; RATNIEKS, F.L.W.; GYLLENSTRAND, A.; THOREN P.A. Colony kin structure and male production in *Dolichovespula wasps*, *Mol. Ecol.* 10, 1003-1010, 2001.
- GERKEN, T.; KURTZ, J.; SAUER, K.P.; LUBJUHN, T. DNA preparation and efficient microsatellite analysis from insect haemolymph, *Electrophoresis* 19, 3069-3070, 1998.
- LUSHAI, G.; FJELLSTED, W.; MARCOVITCH, O.; AAGAARD, K.; SHERRANT, T.N.; ALLEN, J.A.; MACLEAN N. Application of molecular techniques to non-lethal tissue samples of endangered butterfly population (*Parnassius apollo* L.) in Norway for conservation management, *Biol. Conserv.* 94, 43-50, 2000.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas sem ferrão. Editora Nogueirapis. 446p. 1997.
- PALUMBI, S.R. Nucleic Acids, II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (eds.). Sunderland Mass.: Sinauer Associates, Inc., 1996, 205-247.
- PEREIRA, J.O.P. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará. 142p. 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989.

STARKS, P.T.; PETERS, J.M. Semi- nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*, Insectes Soc. 49, 20-22, 2002.

WALDSCHMIDT, A.M.; SALOMÃO, T.M.F.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. **Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata*** (Hymenoptera:Apidae, Meliponinae). Braz. J. Genet. 20:421-423, 1997.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A., HIGUCHI, R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, BioTechniques 10, 506-513, 1991.

## Comunicado Técnico, 199

Ministério da Agricultura  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Meio-Norte**

**Endereço:** Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires, Caixa Postal 01, CEP 64006-220 Teresina, PI.

**Fone:** (86) 3225-1141

**Fax:** (86) 3225-1142

**E-mail:** sac@cpamn.embrapa.br

**1ª edição**

**1ª impressão (2006): 120 exemplares**

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Hostón Tomás Santos do Nascimento.

**Secretária: Executiva:** Ursula Maria Barros de Araújo

**Membros:** Paulo Sarmanho da Costa Lima, Humberto Umbelino de Sousa, Fábio Mendonça Diniz, Flávio Flavaro Blanco, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito de Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo e Carlos Antônio Ferreira de Sousa

## Expediente

**Supervisor editorial:** Lígia Maria Rolim Bandeira

**Revisão de texto:** Lígia Maria Rolim Bandeira

**Editoração eletrônica:** Erlândio Santos de Resende

**Normalização bibliográfica:** Orlane da Silva Maia